

## 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*) 유래의 주화세포(cell line) 개발 및 응용

Development and application of continuous cell lines from rock bream *Oplegnathus fasciatus*

주관연구기관	제주대학교
연구책임자	황일선
발행년월	2014-02
주관부처	미래창조과학부
사업관리기관	한국연구재단
NDSL URL	<a href="http://www.ndsl.kr/ndsl/search/detail/report/reportSearchResultDetail.do?cn=TRKO201400005954">http://www.ndsl.kr/ndsl/search/detail/report/reportSearchResultDetail.do?cn=TRKO201400005954</a>
IP/ID	14.49.138.138
이용시간	2017/11/03 17:23:13

### 저작권 안내

- ① NDSL에서 제공하는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, KISTI는 복제/배포/전송권을 확보하고 있습니다.
- ② NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 상업적 및 기타 영리목적으로 복제/배포/전송할 경우 사전에 KISTI의 허락을 받아야 합니다.
- ③ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 보도, 비평, 교육, 연구 등을 위하여 정당한 범위 안에서 공정한 관행에 합치되게 인용할 수 있습니다.
- ④ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 무단 복제, 전송, 배포 기타 저작권법에 위반되는 방법으로 이용할 경우 저작권법 제136조에 따라 5년 이하의 징역 또는 5천만 원 이하의 벌금에 처해질 수 있습니다.

# 일반연구자지원사업 최종보고서 양식

							양식A101	
① 부처사업명(대)	기초연구사업				보안등급(보안, 일반)		일반	
② 사 업 명(중)	일반연구자지원사업				공개가능여부(공개, 비공개)		공개	
③ 세부사업명(소)	기본연구_리서치펠로우							
④ 과제성격(기초, 응용, 개발)	기초		④-1 실용화 대상여부(실용화, 비실용화)			비실용화		
⑤ 과 제 명	국 문	돌돔( <i>Oplegnathus fasciatus</i> ) 유래의 주화세포(cell line) 개발 및 응용						
	영 문	Development and application of continuous cell lines from rock bream <i>Oplegnathus fasciatus</i>						
⑥ 주관연구기관	제주대학교							
⑦ 협동연구기관								
⑧ 주관연구책임자	성 명	황일선			직급(직위)	전임연구원		
	소속부서	해양의생명과학부			전 공	분자유전		
⑨ 연구개발비 및 참여연구원수 (단위: 천원, M·Y)								
년 도	정부출연금 (A)	기업체부담금			정부의 출연금 (B)	상대국 부담금 (F)	합계 G=(A+B+E)	참여 연구원수
		현금 (C)	현물 (D)	소계 E=(C+D)				
1차년도	50,310			0			50,310	
2차년도	50,310			0			50,310	
3차년도	50,310			0			50,310	
4차년도				0			0	
5차년도				0			0	
합계	150,930	0	0	0	0	0	150,930	0
⑩ 총연구기간		2012. 09. 01 - 2015. 08. 31 ( 36 개월)						
⑪ 다년도협약연구기간								
⑫ 당해연도연구기간		2013. 09. 01 - 2014. 08. 31						
⑬ 참여기업	중소기업수		대기업수		기타		계	
							0	
⑭ 국제공동연구	상대국연구기관수		상대국연구개발비		상대국연구책임자수			
<p>관계 규정과 모든 지시사항을 준수하면서 국가연구개발사업에 따라 수행 중인 연구개발과제의 최종보고서를 붙임과 같이 제출 합니다.</p> <p style="text-align: center;">2014 년      2 월      17 일</p> <p style="text-align: center;">주관연구책임자 : 황 일 선 (인)</p> <p style="text-align: center;">주관연구기관장 : 제주대학교 총장 (직인)</p> <p style="text-align: center;">교 육 부 장 관 귀하</p>								

※ 주요 항목 작성 요령

- ② 공개 가능 여부 : 기초연구사업은 공개를 기본으로 함. 단, 불가피하게 비공개(평가 용도 이외에는 연구보고서 배포를 제한하는 경우)로 하는 경우 사유를 양식 중 <연구내용 및 결과>의 10.기타사항 란에 명확히 기재함
- ⑤ 과제명 : 당초 연구과제명(과제명 변경을 재단에서 승인받은 경우는 승인된 과제명)을 기재함
- ⑨ 정부출연금 : 전체 연구기간의 연도별 연구비를 기재함  
참여연구원 수 : 연구책임자를 제외한 참여연구원 수 기재
- ⑩ 총 연구기간 : 연구시작일부터 연구종료일까지 총 연구기간을 기재

※ 셀 보호된 내용 수정 방법 : 해당 셀 선택>마우스 우측버튼 클릭>표셀속성 선택>셀 선택>셀보호 해제

「일반연구자지원사업 협약 연구기간 적용 예」

선정연도	연구기간	총 연구기간	다년도 협약기간	당해연도 협약기간	비고
2010년	1년	2010.05.01~2011.04.30	2010.05.01~2011.04.30	2010.05.01~2011.04.30	
2010년	2년	2010.05.01~2012.04.30	2010.05.01~2012.04.30	2010.05.01~2011.04.30	
2010년	3년	2010.05.01~2013.04.30	2010.05.01~2013.04.30	2010.05.01~2011.04.30	

## < 목 차 >

### I. 연구 계획 요약문

1. 국문 요약문 .....	4
-----------------	---

### II. 연구 결과 요약문

1. 국문 요약문 .....	5
2. 영문 요약문 .....	6

### III. 연구 내용

1. 연구 개발 과제의 개요 .....	7
2. 국내·외 기술 개발 현황 .....	9
3. 연구 수행 내용 및 결과 .....	11
4. 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도 .....	25
5. 연구 결과의 활용 계획 .....	26
6. 연구 과정에서 수집한 해외 과학기술 정보 .....	27
7. 주관연구책임자 대표적 연구 실적 .....	28
8. 참고 문헌 .....	28
9. 연구 성과 .....	30
10. 기타 성과 .....	32

## 〈 연구 계획 요약문 〉

양식 A201

연구의 목적 및 내용	돌돔에서 유래한 지속적으로 배양할 수 있는 주화세포를 개발하고, 이를 이용하여 <i>in vitro</i> 상에서 어류질병을 발생시키는 바이러스에 대한 감수성을 확인한다. 또한 돌돔 주화세포를 이용하여 바이러스를 대량으로 생산하고 바이러스를 불활성화시켜 백신으로써의 효용가능성을 확인한다.		
연구결과	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 돌돔의 다양한 조직(지느러미, 아가미, 심장, 간, 비장, 신장, 두신, 위, 뇌, 생식소)에서 세포를 얻어 primary cell culture 수행</li> <li>- Primary culture 이후 계대 배양하여 선별된 세포들의 냉동보관 가능성 확인</li> <li>- 세포성장에 있어 온도와 FBS가 미치는 영향 분석</li> <li>- 반복된 세포계대배양을 통해 장기간 생존하고 분열 및 증식하는 세포주 확립</li> <li>- 개발된 주화세포의 형태와 성장, 핵형 등의 특징을 관찰하고 냉동보관방법 정립</li> <li>- 개발된 주화세포의 효과적인 transfection 방법을 체계화</li> <li>- 개발된 주화세포의 어류질병 바이러스에 대한 감수성 확인</li> <li>- 돌돔 유래 주화세포를 이용하여 바이러스 증식능력을 확인 후 바이러스를 불활성화하여 백신으로써의 효용가능성 평가</li> <li>- 주화세포를 이용하여 <i>in vitro</i> 상에서 면역반응을 유도한 돌돔의 면역관련 유전자 발현양상을 확인하고 유전자의 기능을 탐색함</li> </ul>		
연구결과와 활용계획	돌돔 유래 주화세포를 이용하여 돌돔과 바이러스 간의 복잡한 상호작용과 면역반응을 이해할 수 있고 이를 이용하여 효과적인 백신 개발이 가능할 것이다. 효과적인 백신과 치료제제들이 개발된다면 폐사로 인한 경제적 손실을 절감시킬 수 있다. 또한 유전자 기능연구를 비롯하여 독성학 평가, 면역연구, 발암연구, 어류세포생리학, 유전자 삽입을 통한 조절 등을 체계적으로 연구할 수 있다. 돌돔 <i>in vivo</i> 실험보다 주화세포를 이용한 <i>in vitro</i> 실험이 시간과 공간 및 노동력을 절약해주고 여러 실험을 빠르게 진행하여 다양한 연구결과를 얻을 수 있다.		
중심어	돌돔	주화세포	백신
	면역관련 유전자	바이러스	

### ☞ 작성 시 유의사항

- 1) 연구계획서(지원신청서) 제출 시의 국문 연구 요약문을 그대로 작성함(당초 내용을 복사 사용 가능함)
- 2) 본 요약문의 내용은 외부에 공개할 수 있음
- 3) 반드시 1페이지 이내로만 기재함

## 〈 연구 결과 요약문 〉

### 〈한글요약문〉

양식 A202

연구의 목적 및 내용	<p>목적: 돌돔에서 유래한 지속적으로 배양할 수 있는 주화세포를 개발하고, 이를 이용하여 <i>in vitro</i> 상에서 어류질병을 발생시키는 바이러스에 대한 감수성을 확인한다. 또한 돌돔 주화세포를 이용하여 바이러스를 대량으로 생산하고 바이러스를 불활성화시켜 백신으로써의 효용가능성을 확인.</p> <p>내용: 돌돔의 다양한 조직(지느러미, 아가미, 심장, 간, 비장, 신장, 두신, 위, 뇌, 생식소)에서 세포를 얻어 primary cell culture 수행, Primary culture 이후 계대 배양하여 선별된 세포들의 냉동보관 가능성 확인, 세포성장에 있어 온도와 FBS가 미치는 영향 분석, 반복된 세포계대배양을 통해 장기간 생존하고 분열 및 증식하는 세포주 확립, 개발된 주화세포의 형태와 성장, 핵형 등의 특징을 관찰하고 냉동보관방법 정립, 개발된 주화세포의 효과적인 transfection 방법을 체계화, 개발된 주화세포의 어류질병 바이러스에 대한 감수성 확인, 돌돔 유래 주화세포를 이용하여 바이러스 증식능력을 확인 후 바이러스를 불활성화하여 백신으로써의 효용가능성 평가, 주화세포를 이용하여 <i>in vitro</i> 상에서 면역반응을 유도한 돌돔의 면역관련 유전자 발현양상을 확인하고 유전자의 기능을 탐색함</p>		
연구결과	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 돌돔의 다양한 조직(지느러미, 아가미, 심장, 간, 비장, 신장, 두신, 위, 뇌, 생식소 등)에서 세포를 얻어 primary cell culture를 수행함</li> <li>- Primary culture 이후 선별된 세포들의 냉동보관 가능성 확인함</li> <li>- 냉동보관된 세포를 여러 번 해동과 냉동을 통해 반복 계대배양을 해 본 후 장기간 생존, 분열 및 증식하는 세포주 선정함</li> <li>- 선정된 세포의 성장에 있어 온도와 FBS가 미치는 영향을 분석함</li> <li>- 개발된 돌돔 주화세포의 형태와 핵형의 특징 및 냉동보관 방법 확립</li> <li>- 발된 여러 돌돔 주화세포를 이용한 주요 어류질병 바이러스들에 대한 감수성 확인</li> <li>- 개발된 돌돔 주화세포를 이용한 효과적인 transfection 방법 체계화</li> </ul>		
연구결과 의 활용계획	<p>돌돔 유래 주화세포를 이용하여 돌돔과 바이러스 간의 복잡한 상호작용과 면역반응을 이해할 수 있고 이를 이용하여 효과적인 백신 개발이 가능할 것임. 효과적인 백신과 치료제제들이 개발된다면 폐사로 인한 경제적 손실을 절감시킬 수 있다. 또한 유전자 기능연구를 비롯하여 독성학 평가, 면역연구, 발암연구, 어류세포생리학, 유전자 삽입을 통한 조절 등을 체계적으로 연구할 수 있음. 돌돔 <i>in vivo</i> 실험보다 주화세포를 이용한 <i>in vitro</i> 실험이 시간과 공간 및 노동력을 절약해주고 여러 실험을 빠르게 진행하여 다양한 연구결과를 얻을 수 있음.</p>		
중심어	돌돔	주화세포	백신
	면역관련 유전자	바이러스	

※ 표 양식 변경 및 삭제 불가능하며 이미지, 수식, 표의 삽입을 금지하고 특수문자 기호는 전각기호만을 이용하여 작성함

※ 본 요약문은 정보 제공용으로 활용되므로 핵심적인 내용을 중심으로 이해하기 쉽도록 기재하고 한 장 이내로 작성함

## 〈 SUMMARY 〉

양식 A203

Purpose& contents	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Development of long-term cell lines from rock bream</li> <li>■ Characterization of developed cell lines in terms of cell morphology, growth, karyotyping, cryopreservation, susceptibility and transfection efficiency.</li> <li>■ Virus production by using rock bream cell lines for the purposes of inactivated virus vaccine</li> <li>■ Application of cell lines in the studies of immune-related genes of rock bream</li> </ul>		
Result	<p>11 primary cultures have been initiated from different tissues of rock bream after several trials by the means of enzymatic digestion and tissue explants. After 1-year maintenance, 8 continuous cell lines derived from heart, liver, brain, stomach, intestine, kidney and testis grow well in Leibovitz's L-15 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, and have been subcultured for 30-50 times. After long-term cryopreservation in liquid nitrogen, these cell lines could recover in a ratio of more than 90% by maintaining morphology and proliferation ability. The viral susceptibilities of 7 cell lines except for kidney have also been examined towards different pathogenic fish viruses. Advanced cytopathic effects (CPE) after infection have been observed in all 7 cell lines for MABV and IPNV, 6 cell lines for RBIV, 3 cell lines for VHSV and 1 cell line for CSV. It is suggested that these rock bream cell lines have good potentials as a diagnostic tool for isolation and propagation of fish viruses. To investigate the molecular mechanisms involved in cell death caused by RBIV infection in rock bream, we characterized the apoptosis in RBIV infected rock bream heart cell line (RBHT) cells by chromatin condensation, DNA fragmentation and pro-apoptosis gene expression analysis. The results indicate that apoptosis induced by RBIV infection might be an essential anti-viral response. Moreover, the RBHT cell line is proven to be an important tool to study rock bream iridovirus.</p>		
Expected Contribution	<p>The cell lines obtained from the rock bream tissues can be used to understand the interactions between rockbream and iridovirus and to develop vaccines against iridovirus. The cell lines can also be used to study the function of unknown genes, to study fish immunology as well as fish physiology.</p>		
Keywords	Rockbream	Cell lines	Vaccines
	Immune related genes	Virus	

※ 표 양식 변경 및 삭제 불가능하며 이미지, 수식, 표의 삽입을 금지하고 특수문자 기호는 전각기호만을 이용하여 작성함

※ 본 요약문은 정보 제공용으로 활용되므로 핵심적인 내용을 중심으로 이해하기 쉽도록 기재하고 한 장 이내로 작성함

## < 연구내용 및 결과 >

양식 A301

- ◎ 1. 연구개발과제의 개요 ~ 10. 중요 연구변경 사항을 항목에 따라 작성함
- ◎ 제목 14point, 소제목 12point, 본문내용은 10point로 작성하며, 줄 간 간격은 조정 가능함
- ◎ 연구내용 및 결과는 50페이지 이내로 작성함
- ◎ 내용 작성과 관련한 설명내용(청색 박스로 표시된 부분)은 내용 작성 시 제거하고 기술함

### 1. 연구개발과제의 개요

※ 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등을 기술

#### 가. 연구배경

- 어류 조직/세포 배양을 통한 실험은 다양한 생물 중에서 특히 어류에 대해서 생물학적으로 쉽게 접근할 수 있는 *in vitro* 실험모형으로서의 장점을 지니고 있다. 현재까지 연구자들에 의하여 조직/세포 배양을 통한 어류 독성학, 병리학과 면역학적 연구에 필요한 *in vitro* 실험방법들이 많이 개발되었다. 이러한 *in vitro* 실험방법은 여러 환경적 요인에 영향을 받는 *in vivo* 실험과는 달리 실험조건을 정확하게 통제할 수 있다. 어류는 실험하는 환경에 따라 다양하게 반응하고 자라는 양식 환경과 종묘에 따라 같은 종일지라도 유전학적 차이에 따른 반응이 다를 수 있기 때문에 안정적인 실험결과를 반복적으로 얻기가 매우 어렵다. 어류 조직/세포배양을 통한 *in vitro* 실험은 실험조건을 인위적으로 통제할 수 있기 때문에 반복적이고 객관적인 실험을 하기에 용이하며 이를 통해 얻은 결과는 큰 신뢰도를 얻는다.

#### 나. 연구의 필요성 및 중요성

##### (1) 어류 주화세포(cell line) 개발의 필요성 및 중요성

- 어류세포를 이용한 실험은 크게 두 가지 형태로 나눌 수 있다. 첫 번째는 어류에서 바로 조직이나 세포를 채취하여 배지에 넣고 1~2주간 실험하는 primary cell/tissue culture이고 두 번째는 어류에서 채취한 조직과 세포를 적절한 방법을 통해 안정적인 세포분열을 유도하여 배지에서도 계속적으로 성장 및 분열할 수 있는 상태의 주화세포(cell line)를 이용한 실험이다.
- Primary cell/tissue culture는 어류에서 조직과 세포를 얻어내어 바로 실험에 사용하기 때문에 여러 실험을 하기에는 세포의 재생력과 균질성이 부족하다. 특히 어류에서 특정 조직의 세포를 실험하고자 할 때 어류의 상태에 따라 충분한 세포를 얻기 위해서는 조직이 다소 작아 다수의 어류를 해부하여 세포를 채집해야 되고 각 개체마다의 다양성과 차이점 때문에 같은 실험임에도 불구하고 차이가 큰 실험 결과를 얻게 되는 경우가 많다. 또한 primary cell culture를 위해 얻어진 조직과 세포는 여러 단계를 거치면서

하나하나의 세포로 분리시켜야 한다. 이 과정에서 분리되는 세포들은 손상을 입게 되어 재생능력이 감소하게 되고 원래 상태로 회복되기까지 시간이 걸리며 실험에 관계된 중요한 유전자들이 제대로 발현되기 위해서는 충분한 안정기간이 필요하게 된다. 그 예로 본 연구실에서 돌돔의 세포사멸과 면역반응에 관계된 유전자들의 발현을 살펴보기 위해 돌돔의 두신(head kidney)의 세포를 primary culture하여 유전자 발현을 살펴보았지만 세포를 얻은 첫 2일째까지만 유의적인 발현 증가를 다소 확인하였을 뿐 지속적인 발현양상을 확인하기에는 부족한 결과를 얻었다. Primary cell culture하여 얻어진 세포는 최대 1~2주 정도만 실험에 사용할 수 있기 때문에 새로운 세포를 얻기 위해서는 매번 어류를 해부하여 조직과 세포를 얻어내야만 한다. 얻어진 세포는 짧은 기간 동안 생존하고 전체적으로 손상을 입은 상태이기 때문에 DNA이나 RNA를 세포에 삽입하기에 무리가 있고 어류 유전자의 세포 내 기능을 확인하기가 다소 어렵다.

- 이처럼 primary cell/tissue culture는 유전학적 및 면역학적 등의 중요 실험을 하기에는 제한적이기 때문에 어류의 특정조직 유래한 지속적으로 배양 가능한 주화세포(cell line)를 개발해야 할 필요성이 있다. 개발된 어류 주화세포를 이용한 실험은 시간과 공간, 재정과 노동력을 절약하면서도 좋은 결과를 주고 여러 방면에 응용할 수 있는 큰 장점을 가지고 있다.

## (2) 어류 주화세포(cell line)의 장점

- 어류 주화세포를 포유동물의 주화세포와 비교하였을 때 포유동물의 주화세포에 비해 계대배양 가능횟수가 높고 조작 및 관리가 용이하다. 변온동물인 어류의 조직에서 유래된 주화세포는 넓은 온도구간에서 배양이 가능하고 다른 광온성 세포들에 비해 대사율이 낮아 장기간 동안 생존할 수 있다. 보통의 정상적인 포유동물의 세포는 최대로 성장 및 분열할 수 있는 횟수가 포유동물의 수명과 마찬가지로 제한적이기 때문에 포유류 주화세포는 악성종양에서 얻어진 세포나 암세포에서 전이시킨 세포, 여러 물질을 통해 암세포화시켜 얻어진 세포 등을 이용하여 완성된다. 어류 유래 주화세포는 지속적으로 세포를 분리하여 배양할 수 있기 때문에 영구적인 수명 또는 계대배양 횟수가 제한이 없는 특징을 가진다. 어류세포에 있어 반복적으로 계대를 하여도 세포가 사멸하지 않는 것은 포유류의 종양세포와 같이 여러 영향에 의해 생겨나는 것이 아니라 원래부터 가지는 특징으로 생각되며 이러한 현상은 아직까지 설명하기에는 충분히 연구되어 있지 않다.

## (3) 돌돔 유래 주화세포의 필요성

- 돌돔은 한국을 비롯한 아시아에서 중요한 양식어종 중 하나이다. 최근 다양한 바이러스성 질병이 발병되면서 돌돔이 폐사하여 크나큰 경제적 손실을 주고 있다[21]. 돌돔에서 질병을 일으키는 바이러스에 대한 연구와 함께 PCR를 이용한 진단법 등이 개발되었지만 돌돔에서의 바이러스 감염에 대한 면역반응과 치료방법 및 백신 등이 아직까지 충분히 연구되어 있지 않다. 돌돔에서 발병되는 바이러스 질병을 제대로 관리하고 통제하기 위해서는 돌돔세포와 바이러스 간의 상호작용에 대한 이해와 효과적인 백신이 필요하다. 건강한 돌돔 유래 주화세포를 이용한 *in vitro* 실험을 통해 바이러스에 대한 세포반응을 빠르게

확인할 수 있고 백신에 필요한 바이러스를 대량으로 생산할 수 있다. 몇몇 병원성 바이러스는 특정 조직이나 기관에 특이적으로 감염되는 특징을 가지고 있으므로 각 조직에서 유래한 주화세포를 이용하면 바이러스가 어떠한 조직과 기관에 먼저 감염되는지 등에 대한 바이러스 질병을 미리 모니터링 할 수 있다[22]. 그러나 안타깝게도 아직까지 돌돔 유래 주화세포에 대한 연구가 보고된 적이 없다. 그렇기 때문에 돌돔의 바이러스 질병을 제어할 수 있는 백신을 개발하고 돌돔의 면역과 생리에 대한 연구를 자세히 하기 위해서는 성장이 좋고 바이러스에 특이적이며 안정적인 세포주기를 가진 돌돔 주화세포가 시급히 필요하다.

## 2. 국내외 기술개발 현황

※ 국내외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술

### 가. 국내·외 연구현황

- 첫 번째 어류 유래 주화세포는 1962년 Wolf와 Quimby에 의해 개발된 무지개송어의 생식세포를 이용한 RTG-2(rainbow trout gonadal cell line)이다[1]. 이후로 여러 어류에서의 주화세포를 완성하려는 연구가 진행되었고 특히 담수어와 소하성 어류(연어 등)의 주화세포가 개발되었다[2]. 오늘에 이르기까지 양식해양어류에서는 주화세포가 많이 만들어지지 않았고 참돔(red sea bream), 농어(sea perch), 터봇(turbot), 넙치(flounder), grouper 등의 어종에서 시도되었을 뿐이다[3-7]. 게다가 미국 세포은행인 ATCC(American Tissue Culture Collection, www.atcc.org)에서는 해양어류 중에서 농어목 어류인 white bass(*Morone chrysops*)의 주화세포인 CRL-2773 등 다수의 주화세포를 보유하고 있다. 한국에서는 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 지느러미와 비장에서 유래된 2개의 주화세포가 완성되어 있다[5].

### 나. 어류 주화세포 응용분야

- 어류 주화세포는 어류에 질병을 일으키는 바이러스를 진단하고 동정하는 실험에서 중요하다. 더 나아가 바이러스 백신을 생산하기 위해서도 꼭 필요하다. 어류 주화세포는 상업적으로 중요한 여러 어종에서 발생하는 유행성 바이러스 질병을 분리하고 확인하는 방법에 이용된다. 표 1에 나타난 것처럼 어류에서 유래된 다수의 주화세포들을 통해서 특정 어류 바이러스를 분리하고 배양하는 것이 가능해졌다[8]. 또한 각각의 주화세포는 주화세포마다의 성장 조건과 광범위한 바이러스에 대한 감수성 등의 여러 특징이 체계화되어 있다. 그렇기 때문에 세계적으로 어류질병을 진단하고 연구하는 여러 연구실에서 어류 주화세포를 폭넓게 사용하고 있다. 표 2와 같이 이미 선진국에서는 수출증명을 위한 특정바이러스들을 확인하는 검열에서 바이러스 질병을 진단하고 분리하기 위하여 각각의 바이러스마다 주화세포가 지정되어 있다[8].

표 1. 어류 바이러스와 어류 주화세포에서 분리할 수 있는 조건

바이러스	유형	감수성 있는 주화세포	최적 배양온도 (℃)
Atlantic salmon reovirus (TSRV)	Reovirus	EPC, CHSE-214, SHK-1	15
Herpesvirus salmonis (HS)	Herpesvirus	CHSE-214, RTG-2	10
Infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV)	Rhabdovirus	CHSE-214, EPC, FHM, RTG-2	15
Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)	Birnavirus	BF-2, CHSE-214, EPC, RTG-2	15
Infectious salmon anaemia virus (ISAV)	Orthomyxovirus	SHK-1, CHSE-214	15
Oncorhynchus masou virus (OMV)	Herpesvirus	CHSE-214, RTG-2	10-15
Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV)	Iridovirus	FHM, BF-2, RTG-2	15-24
Viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV)	Rhabdovirus	BF-2, CHSE-214, EPC, FHM, RTG-2	15
Chinook salmon paramyxovirus (CSPV)	Paramyxovirus	CHSE-214	15-20
Chum salmon reovirus (CSRV)	Reovirus	CHSE-214	15

표 2. 여러 국가에서 바이러스 질병진단에 사용되는 주화세포들

국가/기관	바이러스	지정된 주화세포
UK	모든 종류	BF-2 및 EPC RTG-2 (back up)
EU	VHSV, IHNV	BF-2 (또는 RTG-2) EPC (또는 FHM)
USA	OMV IHNV IPNV VHSV Rhabdoviruses OMV/IPNV	CHSE-214, RTG-2 EPC, CHSE-214, FHM BF-2, CHSE-214, RTG-2 CHSE-214, EPC, FHM, RTG-2 EPC CHSE-214
Canada	모든 종류	RTG-2, CHSE-214, FHM에서 2종류 선택
OIE	EHNV IHNV OMV	BF-2 또는 FHM EPC 또는 BF-2 CHSE-214 또는 RTG-2

SVCV	EPC 또는 FHM
VHSV	BF-2 또는 EPC 또는 RTG-2
IPNV	BF-2 또는 CHSE-214
ISAV	SHK-1 또는 ASK

■ 어류 주화세포는 어류의 면역학, 세포유전학, 환경독성학, 내분비학, 발암연구, 세포생리학, 생명공학, 생의학 등을 연구하기에 적합한 모델로서 사용될 수 있다[9-12].

- 다양한 세포 생리학적 기전연구를 위한 *in vitro* 실험: 틸라피아와 장어, 잉어, 무지개송어에서 뇌하수체 세포를 배양하여 성장호르몬인 prolactin과 gonadotropin의 생산에 대한 연구가 진행된 바 있다[13-15].
- 세포의 핵형(karyotypes)과 세포유전학적 연구에 응용: 다양한 기관과 배아조직, 백혈구세포 등에서 얻어진 세포를 통해 염색체 다형성(polymorphism)과 특이성, 진화적 연구를 할 수 있다[16-18].
- 오염물질의 독성을 확인할 수 있는 어류 주화세포의 *in vitro* 모델: 살아있는 어류에 오염원 또는 독성물질을 노출시키는 실험보다는 *in vitro* 실험인 세포수준에서의 독성에 대한 반응이 안전하고 정확하게 살펴볼 수 있다[19, 20].

### 3. 연구수행 내용 및 결과

※ 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과를 기술

#### 가. 연구방법

##### ■ 실험동물

평균무게 50 g, 평균크기 20 cm 정도의 건강한 돌돔 치어를 선별하여 실험실 수조에 옮기고 1주일간 순치시켰다. 돌돔의 조직을 무균상태로 채집하기 위해 500 IU/ml 농도의 penicillin과 500 µg/ml 농도의 streptomycin를 처리한 24 °C 해수에 담아 24시간 순치시켰다.

##### ■ Primary culture

무균처리 된 돌돔을 얼음에서 15분 동안 안정시킨 뒤 70% 에탄올에 10초간 담가 표면을 살균시켰다. 돌돔을 해부하여 심장과 신장, 두신(head kidney), 비장, 간, 아가미, 위장, 지느러미, 뇌, 생식소 등을 무균상태를 유지하며 채집하였다. 채집한 조직은 ml 당 400 U의 penicillin과 400 µg의 streptomycin, 2.5 µg의 Fungizone이 포함된 Hank's balanced salt solution (HBSS, Sigma)에 담구었다. 조직을 1 mm<sup>3</sup>정도의 크기가 되도록 멸균된 blade와 해부용 가위를 이용하여 잘게 자른 뒤 항생제가 포함된 HBSS와 Leibovitz-15(L-15) 배지로 각각 3번씩 세척하였다. 절편배양을 위해 1~2 mm<sup>3</sup>크기로 잘려진 조직 25개의 절편을 50 µl의 FBS(fetal bovine serum)가 처리된 25 cm<sup>2</sup>크기의 세포배양 flask(SPL)에 절편 간의 거리를 두어 위치시켰다. 절편이 자리를 잡을 수 있도록 flask를 상온에서 8시간 동안 방치한 뒤 20% FBS와 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 포함된 L-15 배지를 첨가하였다. 효소를 이용하여 조직에서 세포를 분리시키기 위해 잘려진 조직에 1% collagenase (Sigma)를 처리하여 20 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 세포용액을 70 µm cell strainer에 여과시키고 1000 rpm에서 5분간 원심

분리하여 세포를 모았다. 배지로 세포를 부유시켜 25 cm<sup>2</sup> flask당 5 x 10<sup>5</sup> 정도의 세포가 포함되도록 분주하였다. 모든 flask는 24 °C 배양기에서 배양하며 3일마다 새로운 배지로 교체시켰다. 일정시간마다 각각의 flask는 세포의 부착 및 퍼져나간 정도, 세포의 증식과 형태를 현미경으로 자세히 관찰하였다. 세포가 flask 바닥을 95% 정도 덮을 만큼 증식되었을 때 배지를 제거한 뒤 0.2 % Ethylene Diamine Tetra Acetic acid(EDTA)가 포함된 PBS로 남은 배지를 세척하고 0.25 % trypsin solution을 처리하여 flask 바닥에 붙은 세포를 떨어뜨렸다. 배지로 세포를 부유시켜 새로운 flask에 분주하고 20% FBS가 포함된 L-15 또는 MEM 배지를 첨가하여 2차 계대배양하였다. 처음 10번의 계대배양 동안 원래 있던 배지의 50%를 새로운 배지로 교체하여 주고 그 후에는 세포 상태를 확인하여 FBS의 농도를 10%로 낮춘 L-15 배지에서 배양하였다.

#### ■ 세포성장에 있어 온도와 FBS가 미치는 영향

세포성장은 온도와 FBS 농도에 큰 영향을 받으며 20번 이상 계대 배양하여도 영향에 따른 세포변화를 관찰하였다. 1.5 x 10<sup>4</sup> cells/well 농도로 세포를 12 well tissue culture plate에 분주하고 24 °C에서 2시간 동안 배양하여 세포가 바닥에 안정적으로 부착하였다. 세포의 적정 성장 온도를 확인하기 위해 각각의 plate를 10, 15, 20, 25, 30 °C에서 배양하였다. 배양 2, 3, 4, 5, 6일 마다 well에 부착된 세포를 trypsin으로 분리한 후 세포가 각각 원형의 형태로 완전히 떨어졌을 때 hemocytometer를 이용하여 mm<sup>2</sup>당 세포수를 측정하였다(Tong et al, 1997)[21]. FBS 농도에 따른 성장을 확인하기 위해 FBS 농도를 2, 5, 10, 15, 20 %로 맞춘 배지를 첨가하여 24 °C에서 배양한 후 온도 실험과 같은 방법으로 세포수를 측정하였다. 실험에 소요되는 시간은 5일 정도이고 3반복 실험하였다.

#### ■ 냉동보관

지속적으로 배양할 수 있는 주화세포의 특징은 세포를 냉동보관하여 일정시간이 지나 해동하였을 때에도 50% 이상의 세포가 생존하고 안정적으로 분열 및 증식 할 수 있는 것이다. Primary culture 이후 계대배양하여 선별된 세포들의 냉동보관 가능성을 확인하고자 Freshney(1994)이 고안한 방법에 따라 냉동용 배지에 세포를 부유시키고 액체질소(-196 °C)에서 냉동하여 세포의 재생능력과 안정성을 평가하였다[22]. 먼저 계대 횟수가 20번 이상인 돌돌의 세포 중에서 세포성장이 대수기에 이르렀을 때 세포를 원심분리하여 모으고 1 x 10<sup>6</sup> cells/ml 농도로 recovery medium(Invitrogen)로 부유시켰다. 부유시킨 세포를 2 ml sterile cryovial (Nunc)에 1 ml씩 분주하고 4 °C에서 2시간, - 20°C에서 1시간, - 70°C에서 12시간 이상 냉동한 뒤 액체질소에 옮겼다. 한 달 지난 후 냉동된 세포를 37 °C 항온수조에서 빠르게 녹인 뒤 원심분리하여 세포를 모으고 10% FBS가 함유된 L-15 배지로 부유시켰다. 세포를 trypan blue로 염색시키고 hemacytometer로 세포수를 측정하여 생존률을 확인하였다.

#### ■ 핵형(karyotype) 관찰

세포의 염색체를 확인하기 위해 세포를 75 cm<sup>2</sup> 크기의 flask에서 10% FBS가 포함된 L-15 배지를 넣고 배양하였다. 24시간 배양 후에 기존의 배지를 0.1 ml colcemid solution (1 µg/ml, Sigma)가 포함된 새 배지 10ml로 교체하고 24 °C에서 2시간 동안 배양하였다. 1000 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 모아

0.5 % KCl이 함유된 hypotonic solution 으로 부유시켜 10분간 반응시키고 methanol:acetic acid (3:1)의 용액으로 고정시켰다. 고정시킨 세포를 conventional drop-splash technique(Freshney, 1994) 방법으로 슬라이드에 도말하였다[24]. 슬라이드를 5 % Giemsa 용액으로 10분간 염색시킨 뒤 현미경으로 염색체를 관찰하였다.

#### ■ GFP reporter 유전자를 이용한 세포 내 유전자 삽입

돌돔 유래 주화세포에 유전자를 삽입할 수 있는지 확인하고자 pEGFP-N1 plasmid(Clontech)를 이용하였다. 세포를  $5 \times 10^5$  cells/well의 농도로 6 well plate에 분주한 뒤 세포가 바닥에 부착할 수 있도록 배양하였다. 배양 후 Lipofectamine™ 2000(Invitrogen)과 electroporation을 이용하여 세포 내에 pEGFP-N1을 삽입하였다. 24~72시간이 경과하면 형광현미경으로 초록형광 세기를 측정하여 세포 내 삽입한 유전자의 발현정도를 확인하였다.

#### ■ 바이러스 감수성 확인

돌돔의 조직들로부터 얻어진 주화세포가 바이러스에 감수성을 보이는지 확인하기 위해 돌돔이리도바이러스(Rockbreast iridovirus, RBIV)를 비롯하여 viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), marine birnavirus (MABV), infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), chum salmon virus (CSV)를 세포에 감염시켰다. 먼저 계대배양 횟수가 20회 이상인 세포를 12 well plate에 분주하고 바닥을 80% 덮을 정도까지 배양하였다. 배지를 제거한 후 바이러스가 함유된 배지 1 ml를 처리한다. 2시간이 지나면 바이러스가 함유된 배지를 제거하고 10% FBS가 함유된 새 L-15 배지 2 ml를 첨가하여 25 °C에서 배양하였다. 배양된 세포에 CPE가 나타나는지 관찰하고 바이러스 감염여부와 증식농도는 real-time PCR 또는 RT-PCR를 통해 확인하였다.

### 나. 연구결과 요약

■ 돌돔에서 얻어진 조직을 이용하여 여러 시행과정을 거쳐 총 11개 종류의 세포를 primary culture하였다. primary culture를 위해서 조직절편방법(tissue explant method)과 효소분해방법(enzymatic digestion method)으로 조직에서 세포를 분리하였다. 1년의 실험기간 동안 지속적으로 배양할 수 있는 6 종류의 세포주를 심장, 간, 뇌, 지느러미, 정소, 위장에서 얻었고 10% FBS가 포함된 Leibovitz's L-15 배지에서 30~50번 정도 계대하여 배양하였다. 돌돔의 여러 세포주를 액체질소에서 냉동보관 후 해동하여 다시 배양하였을 때 형태와 증식능력이 90% 이상 회복되는 것을 확인하였다. 이 중 돌돔 심장세포주(RBHT cell line)는 20% FBS가 포함된 L-15 배지에서 30°C로 배양온도를 유지하였을 때 가장 좋은 성장곡선을 보였다. 개발한 돌돔 심장세포의 핵형을 분석하였으며 주화세포의 냉동보관 조건을 확립하였다. 어류질병 바이러스를 이용하여 개발한 돌돔 주화세포의 감수성을 확인한 결과 MABV, IPNV, RBIV에는 감수성을 확인할 수 있었으나 VHSV, CSV에는 infection이 되지 않았다.

## 다. 연구 상세 결과

### ■ 돌돔조직으로부터 primary culture 및 반복된 계대배양(subculture)을 통한 세포주(cell line) 선정

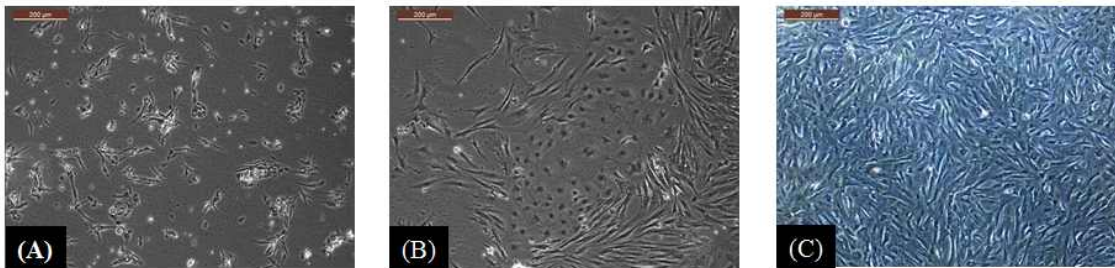
돌돔의 심장, 간, 신장, 두신, 뇌, 지느러미, 소장, 뇌하수체, 정소, 위장, 비장 등을 조직절편방법과 효소분해방법으로 처리하여 돌돔세포를 primary culture하였다. 배양 3~7일 후 심장, 간, 신장, 두신, 뇌, 지느러미, 소장, 뇌하수체, 정소 위장, 비장세포는 colony를 형성하거나 조직절편으로부터 분리되어 나와 증식하기 시작하였다. 이에 반해 돌돔 아가미조직에서는 조직으로부터 분리되어 나온 세포가 배양플라스크에 부착하여 증식되는 것을 관찰하지 못하였고 난소세포의 계대배양은 곰팡이오염으로 인해 실패하였다.

## 1. 조직절편방법(Tissue explant method)을 이용한 cell line 확립

### ▶ 심장 세포주(Heart cell line)

심장세포의 계대배양은 collagenase 분해방법으로 실시하였고 배양 14일이 경과하였을 때 배양플라스크 바닥을 가득 덮을 정도로 증식하였다(Fig. 1). 계대배양은 7~10일마다 1:2 비율로 배양하였다. 심장세포주의 초기 계대배양에서는 상피유사세포(epithelial-like cell)와 섬유아세포유사세포(fibroblast-like cell)가 동시에 관찰되었다. 15번의 계대배양을 거친 후에는 섬유아세포유사세포만이 관찰되었다(Fig. 1).

**Fig. 1 Heart cell line**



(A) 4 day-old heart culture isolated using enzymatic disaggregation

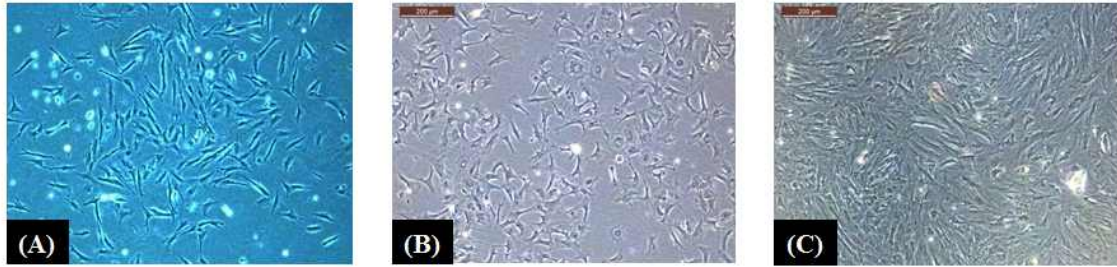
(B) Mixture of fibroblast- and epithelial-like cells

(C) Heart cell line with pure fibroblast-like cells

### ▶ 간 세포주(Liver cell line)

간세포주는 초기배양부터 섬유아세포유사세포로만 구성되어있었다. 간세포주를 초기배양할 때는 10일마다 1:2 비율로 계대배양하였다. 계대수 30 이후로는 세포 증식속도가 눈에 띄게 증가하였고 현재는 6~7일마다 1:2 비율로 계대배양 중이다(Fig. 2).

**Fig. 2 Liver cell line**



(A) 4 day-old liver culture isolated using enzymatic disaggregation

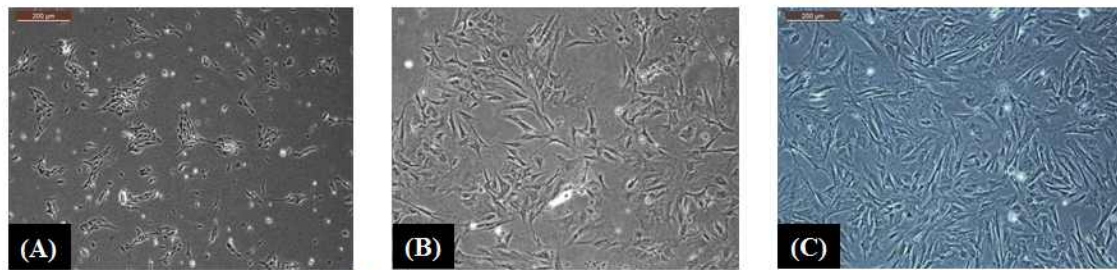
(B) Subcultured liver cells

(C) Liver cell line with confluence

▶ 신장 세포주(kidney cell line)

신장세포주는 간세포주와 비슷하게 초기배양에서부터 섬유아세포 유사세포들만이 관찰되었다. 증식속도는 간세포주와 비슷하여 7일마다 1:2 비율로 계대배양 중이다(Fig. 3).

**Fig. 3 Kidney cell line**



(A) 4 day-old kidney culture isolated using enzymatic disaggregation

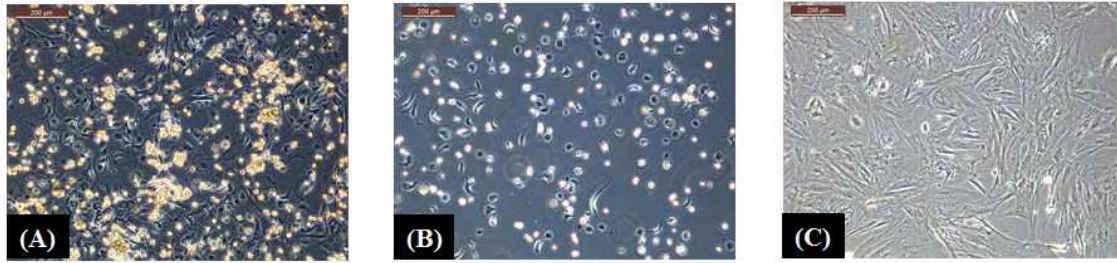
(B) Subcultured kidney cells

(C) Kidney cell line with confluence

▶ 두신 세포주(Head kidney cell line)

두신에서의 초대배양에서는 부착형 섬유아세포 유사세포와 대식세포 유사세포, 미부착 또는 반부착 원형세포들이 관찰되었다(Fig. 4B). 계대배양 후에는 미부착 원형단핵구 유사세포들이 플라스크에 부착하였고 대식세포의 형태가 관찰되는 것으로 보아 원래의 세포들이 대식세포/단핵구 유사세포임을 알 수 있다. 그러나 대식세포/단핵구 유사세포 또는 부착형 대식세포의 많은 증식을 확인할 수 없었다. 계대수 10 이후두신세포주는 섬유아세포들로만 이루어져 있었다. 그러나 이 섬유아세포들은 이전 연구에서 보고된 것처럼 몇 번의 초기배양동안 빠르게 손상되었다. 세포질에는 공포가 관찰되고 세포형태는 점점 편평해졌으며 증식속도는 크게 감소하였다. 이렇게 손상된 두신세포주는 회복되지 못하였고 결국 세포가 확산되어 증식되는 가능성은 확인되지 않았다(Fig. 4).

**Fig. 4 Head kidney cell line**



(A) 7 day-old head kidney culture isolated using enzymatic disaggregation

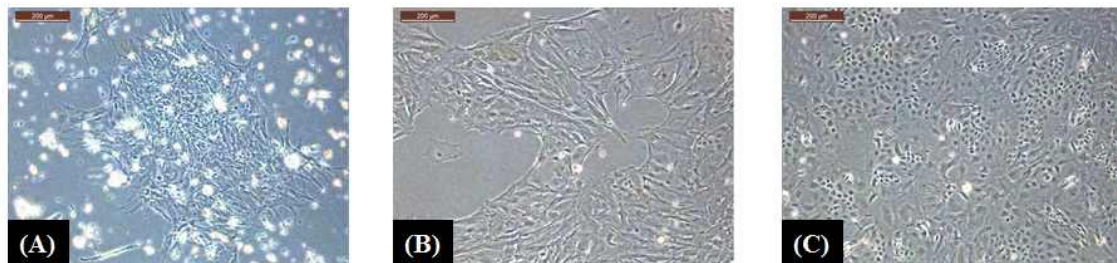
(B) Monocyte-macrophage like cells

(C) Fibroblast-like cells

#### ▶ 뇌 세포주(Brain cell line)

초기배양에서부터 뇌세포주에서는 상피유사세포만이 관찰되었다. 7일마다 1:2 비율로 지속적으로 계대배양이 가능하였다(Fig. 5).

**Fig. 5 Brain cell line**



(A) 6 day-old brain culture isolated using enzymatic disaggregation

(B) Subcultured brain cells

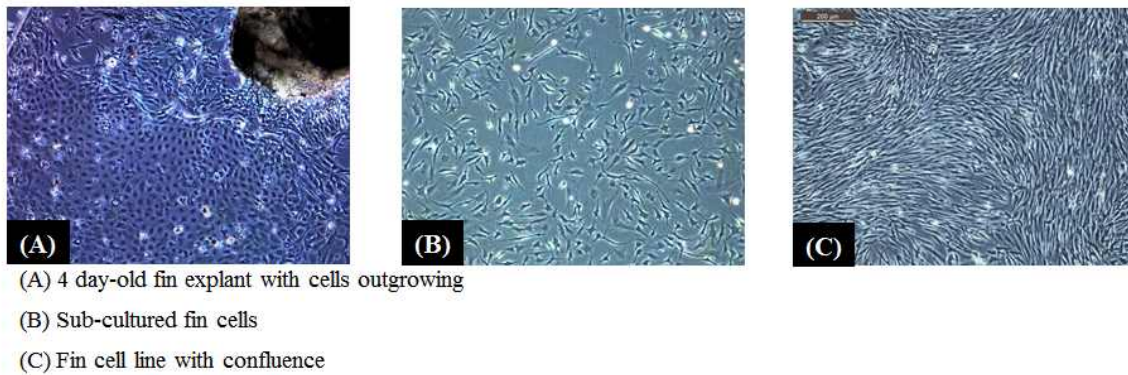
(C) Brain cell line confluence

## 2. 효소분해방법 (Enzymatic digestion method)을 이용한 cell line 확립

#### ▶ 지느러미 세포주(Fin cell line)

Fig. 6를 살펴보면 초대배양 2일 후 지느러미 조직절편에서 세포들이 분리되어 나와 증식된 것을 확인할 수 있다. 처음으로 플라스크 바닥에 가득 증식한 세포는 섬유아세포유사세포와 상피유사세포로 구성되어있었다. 그러나 몇 번의 계대배양을 거치면서 섬유아세포유사세포만이 증식 및 관찰되었다. 다른 세포주와는 달리 지느러미세포주는 계대수 10까지 증식속도가 매우 빨랐으며 4~5일마다 1:3 비율로 계대배양되었다. 계대수 약 20에 다다랐을 때 두신세포주와 비슷한 세포손상이 관찰되고 증식속도가 다소 감소되었으나 결과적으로 건강한 세포로 회복되었다(Fig. 6).

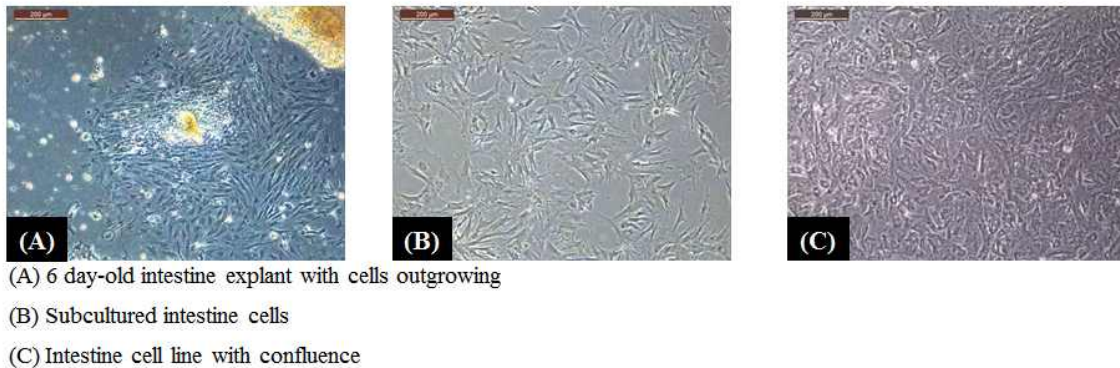
**Fig. 6 Fin cell line**



▶ 소장 세포주(Intestine cell line)

초대배양한지 4일 후부터 소장조직절편에서 세포들이 분리되어 나와 증식하였으며 빠르게 플라스크를 덮을 정도로 확산되었다. 세포는 형태적으로 섬유아세포와 유사하였고 1:2의 비율로 5~7일마다 계대배양하였다 (Fig. 7).

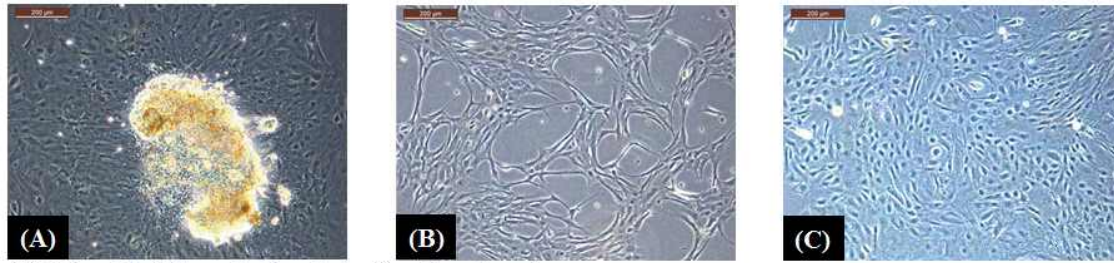
**Fig. 7 Intestine cell line**



▶ 뇌하수체 세포주(Pituitary gland cell line)

소장세포주와 비슷하게 뇌하수체조직 초대배양 4일 후부터 조직절편에서 세포가 분리되기 시작하였으며 빠르게 증식하였다. 뇌세포주와 마찬가지로 세포의 형태는 상피세포와 유사하였다. 초기배양 때는 5일마다 1:3의 비율로 계대배양하였다. 계대수 20이 지나면서 세포주의 성장이 이상해졌고 계대배양 1~2일 후 급속도로 세포가 괴사하였다. 결과적으로 뇌하수체 세포는 세포주로서의 가능성이 없다고 판단된다(Fig. 8).

**Fig. 8 Pituitary gland cell line**



(A) 6 day-old pituitary gland explant with cells outgrowing

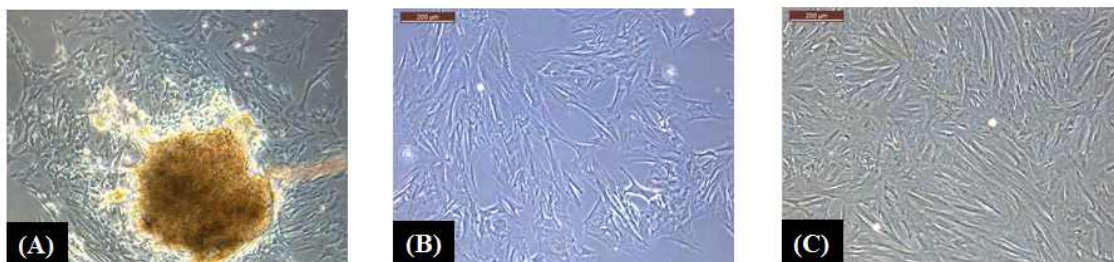
(B) Subcultured pituitary cells

(C) Pituitary gland cell line with confluence

▶ 정소 세포주(Testis cell line)

정소세포주는 정소조직절편에서 얻어졌으며 초대배양 24시간 후부터 조직에서 세포들이 빠르게 분리되어 나와 증식하기 시작하였다. 이들 세포는 2주동안 플라스크 바닥을 단일세포층으로 덮을 정도로 증식하였다. 정소세포주는 섬유아세포와 형태가 유사하였으며 계대수 15까지는 1:2의 비율로 4일마다 계대배양되었다. 그러나 증식속도가 감소되면서 그 후의 계대배양은 7일마다 1:2의 비율로 실시되었다(Fig. 9).

**Fig. 9 Testis cell line**



(A) 6 day-old testis explant with cells outgrowing

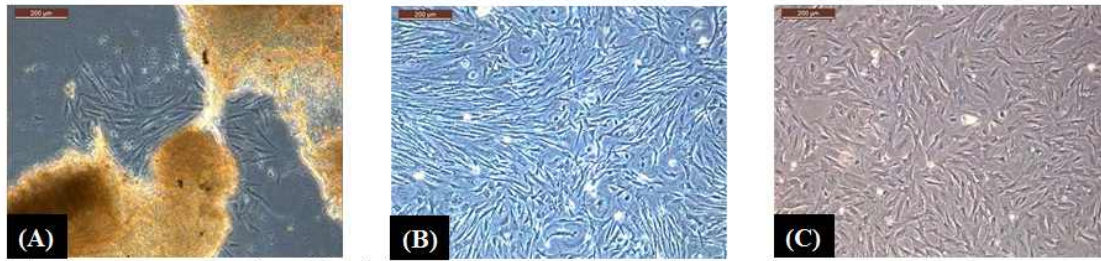
(B) Subcultured testis cells

(C) Testis cell line with confluence

▶ 위장 세포주(Stomach cell line)

위장세포는 초대배양 6일후부터 위장조직절편에서 분리되어 나오기 시작하였다. 이들 세포는 단일세포층을 이루기까지 10일정도가량 증식하였다. 흥미롭게도 위장세포주는 섬유아세포와 유사한 형태를 띠다가 플라스크를 가득 덮을 정도로 증식하면 그 형태가 원형의 상피유사세포로 바뀌었다. 위장세포주를 40번 이상 계대배양하여도 빠르게 증식하였으며 5일마다 1:3 비율로 계대배양할 수 있었다(Fig. 10).

**Fig. 10 Stomach cell line**



(A) 6 day old stomach explant with cells outgrowing

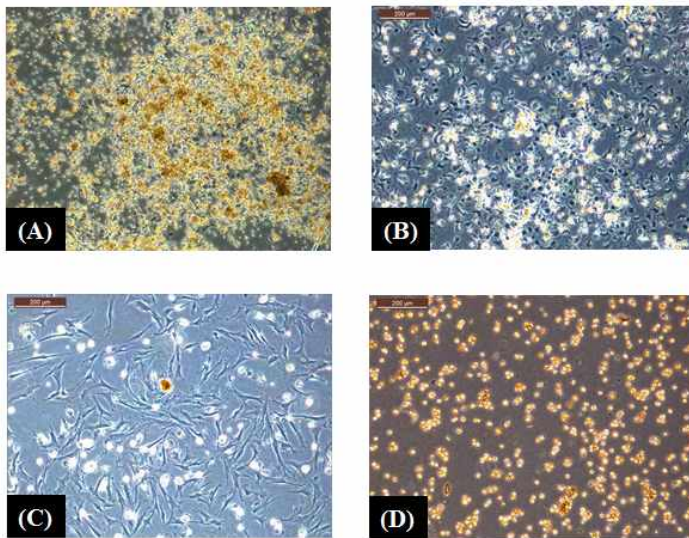
(B) Subcultured stomach cells

(C) Stomach cell line with confluence

### ▶ 비장 세포주(Spleen cell line)

두신세포주처럼 배양된 비장세포는 부착형 섬유아세포와 부착형 대식세포, 반부착 원형의 단핵구으로 구성되어 있었다. 비장의 섬유아세포와 대식세포는 결과적으로 지속적인 증식 가능성이 없었다. 단핵구인 경우 20% FBS가 함유된 L-15 배지에서 4달 동안 5번의 계대배양을 성공했으나 그 이후 증식하지 않았으며 계대된 세포들은 사멸되었다(Fig. 11)

**Fig. 11 Spleen cell line**



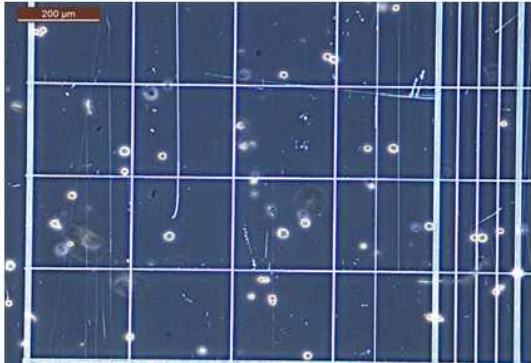
(A) 6 day old spleen explant with cells outgrowing (B) Macrophage-like cells

(C) Fibroblast-like cells (D) Monocyte-macrophage like cells

### 3. 세포주의 냉동보존과 해동

Fig. 12의 심장세포주(Heart cell line)처럼 계대수가 다른 각각의 세포주들이 냉동보관 후 해동하였을 때 90% 이상의 생존능력을 보였으며 플라스크 바닥을 가득 덮을 정도로 자라기까지 1주일이 소요되었다. 돌돌세포의 형태와 증식능력은 냉동보존하기 전과 다르지 않았다(Fig. 12).

**Fig. 12** The viability of recovered Heart cell line after 3 month cryopreservation in liquid nitrogen. Less than 10% of cells were dead and stained by trypan blue



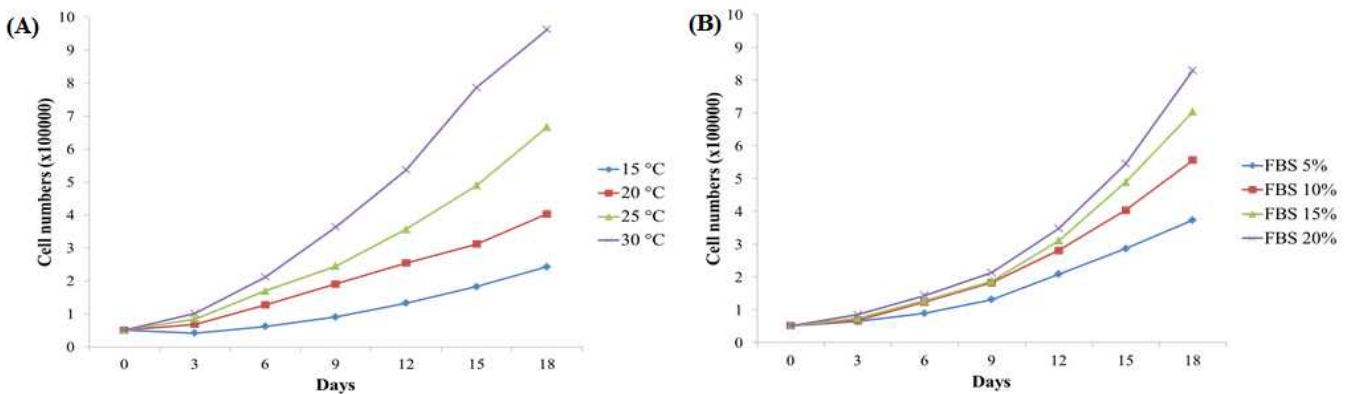
#### 4. 반복 계대배양 후 장기간 생존, 분열 및 증식하는 세포주 선정

냉동 보관된 각각의 다른 세포주를 해동하여 30-50번의 반복 계대배양 후 안정적으로 증식하는 세포주를 살펴보았다. 총 11개의 세포주(심장, 간, 신장, 두신, 뇌, 지느러미, 소장, 뇌하수체, 정소, 위장, 비장)중에서 현재까지 생존, 분열 및 증식하는 세포주로 6개의 세포주(심장, 간, 뇌, 지느러미, 정소, 위장)를 선정하였다.

#### 5. 온도와 FBS 농도에 따른 성장특성

Fig. 13에서 확인할 수 있듯이 돌돔의 심장세포주(Heart cell line, RBHT)는 배양온도와 FBS 함량 조건에 따라 다른 성장곡선을 보여준다.

**Fig. 13** Growth response of the Heart cell line at the 30<sup>th</sup> passage to selected temperatures (A) and different concentrations of fetal bovine serum (FBS) (B)



돌돔 심장세포주의 최적성장온도는 계대수 30일 때 30℃ 이었다. 적당한 성장온도는 25℃로 7~10일 간격으로 계대배양하기에 알맞은 온도이다. 15℃로 배양하였을 때 성장률이 크게 감소하였고 배양 3주 동안 유의적인 세포증식이 없었다. 25℃에서 FBS 함량을 5에서 20%으로 증가하였을 때 세포의 증식률이 증가하였다. 그러나 FBS가 10% 이상 배지에 첨가된 경우 처음 1주일동안은 세포증식에서 큰 차이가 없었다. 그렇기 때문에 FBS가 20% 농도로 배지에 첨가되었을 때 최적의 성장을 보여주었으나 일상적인 RBHT 계대배양에는 10% FBS의 배지를 사용하였다.

## 6. 돌돔 주화세포의 핵형 분석

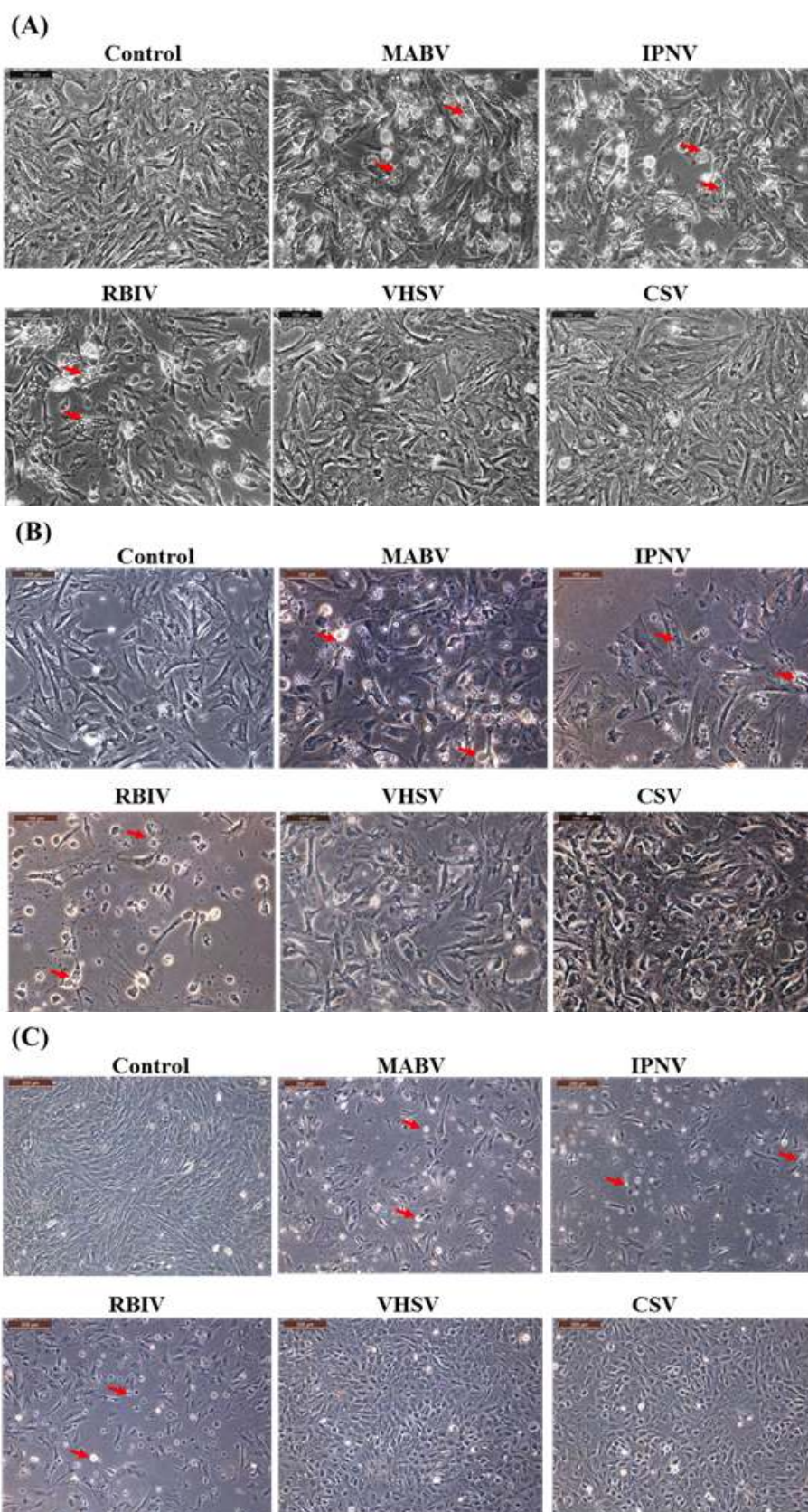
그림 14는 cell passage 60일 때 돌돔의 heart cell line을 사용하여 chromosome을 분석한 결과로 염색체의 수가 43개부터 50개로 다양한 수의 chromosome을 관찰할 수 있었다.

Fig. 14 Chromosome analysis of the *rock bream* heart cells at passage 60. The results of chromosome counts of 50 metaphase plates from rock bream heart cells at passage 60 revealed that the chromosome numbers varied from 43 to 50, with a mode of 48.

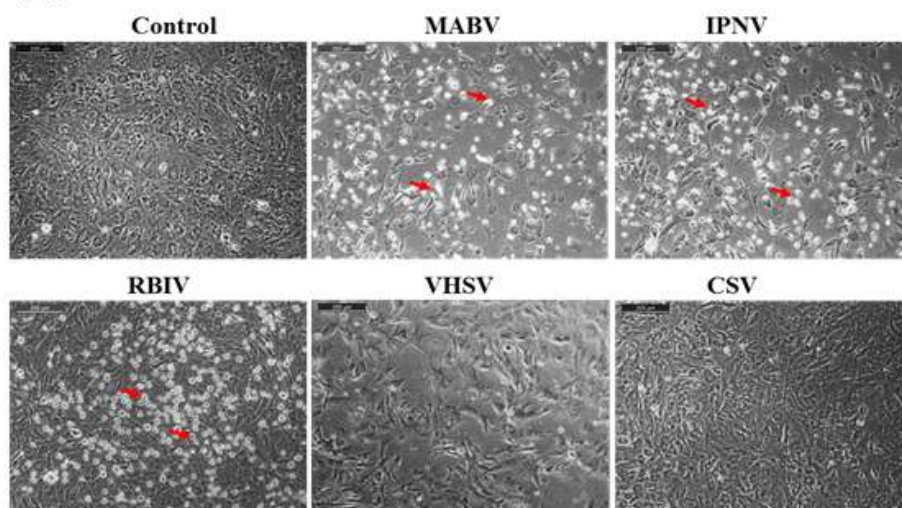


## 7. 돌돔 주화세포의 어류바이러스에 대한 감수성 test

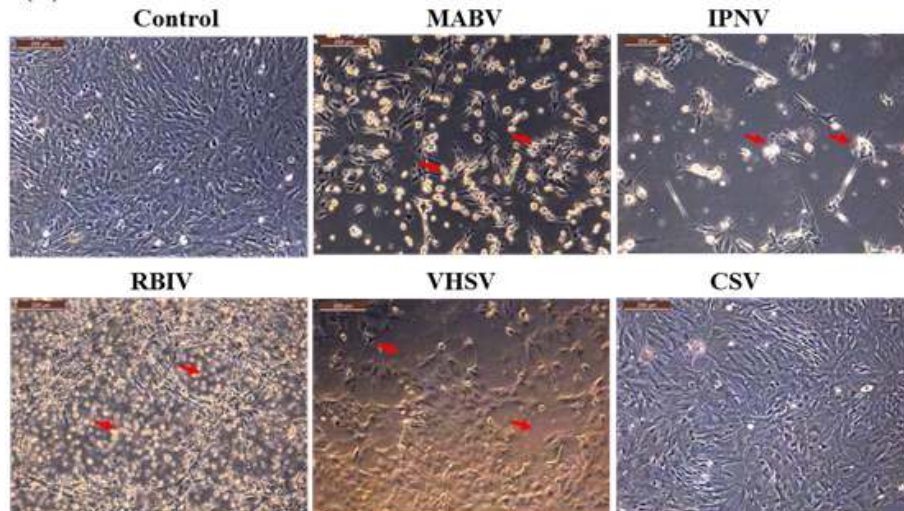
돌돔 iridovirus와 다양한 어류바이러스 (VHSV, MABV, IPNV, CSV)를 이용하여 개발한 돌돔 주화세포를 infection시켜 감수성을 확인하였다. 주화세포를 12-well plate에 약 80-90%정도의 밀집도가 되게 칸 다음 배지를 제거하고 바이러스 1 ml를 사용하여 접종하였다. 2 시간의 흡착기간 후 바이러스 배양액을 제거하고 10% FBS가 포함된 2 ml L-15 배지를 첨가하였다. 25℃에서 배양하면서 CPE를 매일 관찰하였다. 바이러스의 증식은 real-time PCR 또는 RT-PCR을 이용하여 관찰하였다. 그림 15는 바이러스에 대한 주화세포의 감수성 test 결과로서 MABV, IPNV를 접종한 세포에서 3일내에 CPE를 확인할 수 있었으며, RBIV를 접종한 세포에서는 testis cell line을 제외한 나머지 cell line에서 접종 후 2일 만에 대부분의 세포에서 CPE를 확인할 수 있었다. VHSV를 접종한 brain, fin, testis cell line에서 접종 4일 후 cell의 변화를 관찰할 수 있었다.



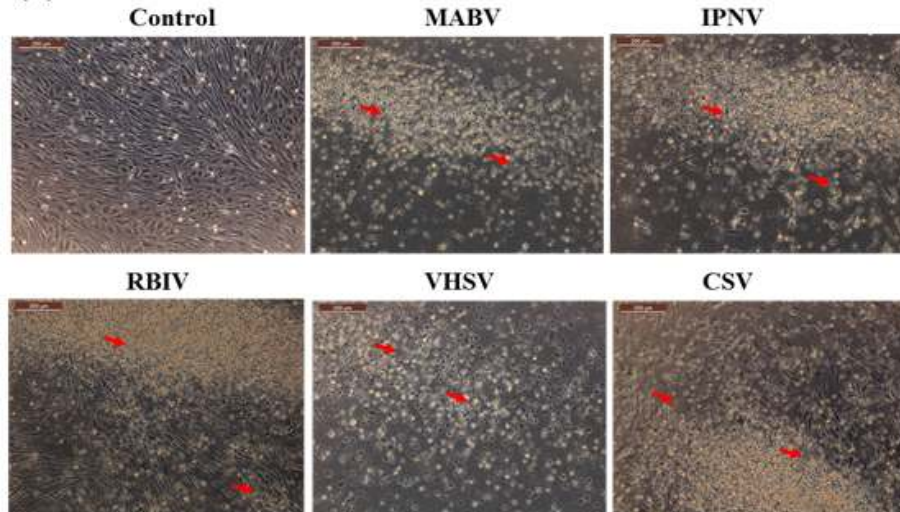
(D)

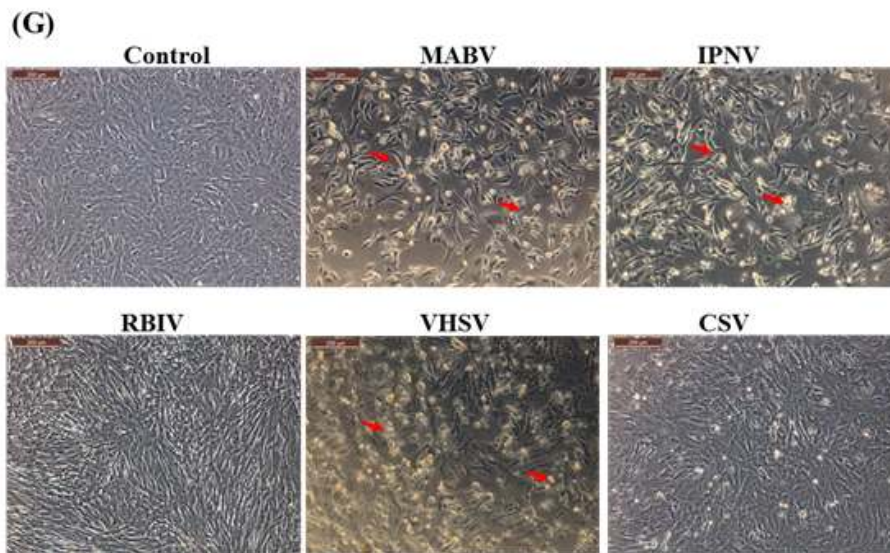


(E)



(F)

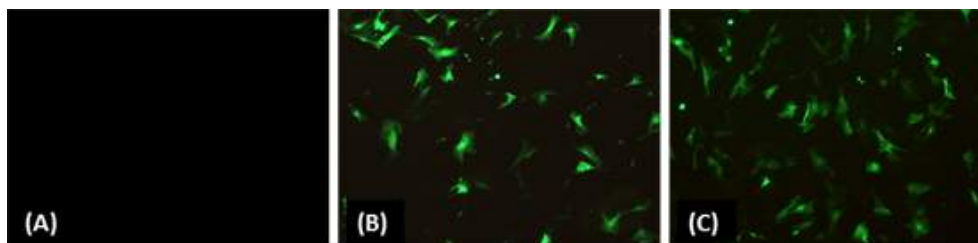




**Fig. 15** Viral susceptibilities of rock bream heart (A), liver (B), stomach (C), intestine (D), brain (E), fin (F) and testis (G) cell lines. CPE is indicated by arrows.

#### 8. 돌돔 heart cell line을 이용한 DNA transfection efficiency 확인

돌돔 heart cell line을 이용하여 DNA transfection efficiency를 확인하였다. pEGFP-N1 vector를 lipofectamine 2000과 electroporation 방법을 사용하여 transfection시켜 transfection 효율을 확인 한 결과 lipofectamine 2000과 electroporation 방법의 경우 각각 60, 80%의 transfection 효율을 확인할 수 있었다 (그림 16).



**Fig. 16** Expression of GFP gene in RBHT cells (A) control, (B) electroporation and (C) lipofectamine 2000 mediated

#### 4. 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

※ 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전예의 기여도를 기술

목 표	달성도(%)	내 용
돌돔의 다양한 조직(지느러미, 아가미, 심장, 간, 비장, 신장, 두신, 위, 뇌, 생식소 등)에서 세포를 얻어 primary cell culture를 수행	100	조직절편방법(심장, 간, 신장, 두신, 뇌)과 효소분해방법(지느러미, 소장, 뇌하수체, 정소, 위장, 비장)으로 처리하여 다양한 돌돔세포를 primary culture하였음.
Primary culture 이후 선별된 세포들의 냉동보관 가능성 확인	100	각각 다른 돌돔 세포주들을 냉동보관 후 해동하였을 때 90% 이상의 생존능력을 보였으며 플라스크 바닥을 가득 덮을 정도로 자라기까지 1주일의 소요되었다. 돌돔세포의 형태와 증식능력은 냉동보존하기 전과 다르지 않았음
냉동보관된 세포를 여러 번 해동과 냉동을 통해 반복 계대배양을 해 본 후 장기간 생존, 분열 및 증식하는 세포주 선정	100	총 11개의 돌돔 세포주(심장, 간, 신장, 두신, 뇌, 지느러미, 소장, 뇌하수체, 정소, 위장, 비장)중에서 현재까지 안정적으로 증식하는 세포주로 6개의 세포주(심장, 간, 뇌, 지느러미, 정소, 위장)를 선정하였음.
선정된 세포의 성장에 있어 온도와 FBS가 미치는 영향 분석	100	돌돔 심장세포주(RBHT cell line)는 20% FBS가 포함된 L-15 배지에서 30℃로 배양온도를 유지하였을 때 가장 좋은 성장곡선을 보였음.
개발된 돌돔 주화세포의 형태와 핵형의 특징 및 냉동보관 방법 확립	100	돌돔 주화세포의 핵형을 분석하였으며 냉동조건은 20% FBS, 10% DMSO를 첨가한 L-15배지 사용하였을 때 가장 좋은 결과를 얻었음
개발한 돌돔 주화세포의 바이러스에 대한 감수성 확인	100	개발한 주화세포 (간, 위장, 소장, 뇌, 지느러미, 정소)에 대한 virus (RBIV, VHSV, MABV, IPNV, CSV)의 감수성을 확인하였음
개발한 주화세포의 transfection efficiency 확인	100	돌돔의 heart cell line을 대상으로 lipofectamine과 electroporation을 이용하여 transfection 효율을 확인한 결과 lipofectamine 2000이 약 80%, electroporation이 약 60% 였음

## 5. 연구결과의 활용계획

※ 추가연구의 필요성, 타 연구에의 응용, 기업화 추진방안을 기술

- 이 연구를 통해 돌돔의 여러 조직에서 유래하여 지속적으로 배양 가능한 돌돔 주화세포(cell line)를 개발할 수 있음
- 개발된 세포를 이용한 *in vitro* 실험으로 어류질병바이러스에 대한 감수성의 특징을 확인하고 바이러스의 대량 생산으로 효과적인 백신을 개발할 수 있는 기반을 확립할 수 있음
- 섬유아세포(fibroblast)와 상피세포(epithelial-like cell) 유래 주화세포뿐만 아니라 장기간 배양하기 어려운 백혈구(leukocyte) 유래 주화세포를 개발하여 돌돔의 분자유전학적 및 면역학적 연구를 지속적으로 할 수 있음
- 돌돔 유래 주화세포를 통해 돌돔에서 발병되는 바이러스 질병에 대한 진단법과 효과적으로 대처할 수 있는 백신개발의 기초로 활용할 수 있다.
- 몇몇의 병원성 바이러스는 특정 기관이나 조직에 특이적으로 감염된다. 여러 조직에서 얻어진 다양한 주화세포를 이용하여 세포수준에서의 바이러스 감염양상을 확인하고 중 특이성을 관찰할 수 있으며 바이러스 질병을 미리 모니터링 할 수 있다.
- 돌돔 주화세포를 이용한 *in vitro* 실험을 통해 질병의 발생과 진행과정을 확인하여 감염자와 숙주 간의 복잡한 상호작용을 이해할 수 있고 적절한 치료방법을 개발할 수 있다.
- 돌돔에서 발현되는 유전자들의 기능을 주화세포를 이용하여 확실하게 확인 할 수 있다.
- 돌돔 주화세포를 이용하여 특정 병원균을 빠르게 진단할 수 있는 단일클론항체(monoclonal antibody)나 핵산 탐지자(nucleic acid probe)를 생산할 수 있고 환경독성학적 스크리닝을 할 수 있는 방법을 개발할 수 있는 기반을 마련할 수 있다.
- 생의학적 연구를 통해 약용물질과 치료를 도와주는 여러 물질을 스크리닝 하는데 이용할 수 있다.
- 해양어류의 면역학적 연구와 독성학 평가, 발암연구, 세포생리학, 유전자 삽입 및 유전자 조절 등을 더욱 체계적으로 이해하고 응용하기 위해서는 돌돔뿐만 아니라 주요 해양어류에서 유래한 어류 주화세포를 개발하는 것이 필요하다.

## 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

※ 추가연구의 필요성, 타 연구에의 응용, 기업화 추진방안을 기술

7. 주관연구책임자 대표적 연구 실적

번호	논문명/특허명/기타	소속기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	논문게재일 /특허등록일	특기사항 (SCI여부)
1	Genomic characterization, expression analysis, and antimicrobial function of a glyrichin homologue from rock bream, <i>Oplegnathus fasciatus</i>	제주대학교	교신저자	FISH & SHELLFISH IMMUNOLOGY	2013.11.01	SCI
2					yyyy.mm.dd	
3					yyyy.mm.dd	
4					yyyy.mm.dd	
5					yyyy.mm.dd	

- ※ 대표 연구실적은 총 연구기간 중 발표(게재 확정 포함)된 대표적 연구실적(논문, 특허 등)을 5건 이내로 기재
- ※ 소속기관명 : 연구 성과 발표 시 소속된 기관명을 기재
- ※ 역할 : 논문의 경우 만 작성하며 제1저자, 교신저자, 참여저자 중 선택하여 기재
- ※ 특허 등록 국가 : 특허를 등록한 국가명을 한글로 기재(예시, 대한민국, 미국, 일본 등)
- ※ 특기사항에는 인용 횟수나 우수논문수상 등과 같이 특별히 기술할 필요가 있는 사항을 기재
- ※ 상기의 대표적 논문 및 특허 등록에 대한 내용은(별첨1 : 대표 연구 업적) 서식에 따라 요약문을 작성

8. 참고 문헌

※ 보고서 작성 시 인용된 모든 참고 문헌을 열거

[1] Wolf K, Quimby M. Established eurythermic cell line of fish cells in vitro. Science. 1962 132.

[2] Fryer J.L., G.N. L. Three decades of fish cell culture: a current listing of cell lines derived from fish. Journal of Tissue Culture Methods. 1994 16.

[3] Fernandez RD, M. Yoshimizu, T. Kimura, Y. Ezura, Inouye K, Takemi I. Characterization of three continuous cell lines from marine fish. Journal of Aquatic Animal Health. 1993 5.

[4] Ku CC, Lu CH, Wang CS. Establishment and characterization of a fibroblast cell line derived from the dorsal fin of red sea bream, *Pagrus major* (Temminck & Schlegel). Journal of fish diseases. 2010 33:187-96.

[5] Kang MS, Oh MJ, Kim YJ, Kawai K, Jung SJ. Establishment and characterization of two new cell lines derived from flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). Journal of fish diseases. 2003 26:657-65.

[6] Zhou GZ, Li ZQ, Yuan XP, Zhang QY. Establishment, characterization, and virus susceptibility of a new marine cell line from red spotted grouper (*Epinephelus akaara*). Mar Biotechnol (NY). 2007 9:370-6.

[7] Tong S.L., Miao H.Z., H. L. Three new continuous fish cell lines of SPH, SPS and RSBF derived from sea perch(*Lateolabrax japonicus*) and red sea bream (*Pagrosomus major*). Aquaculture 1998 169.

[8] Crane ; MSJ, Williams LM. Viruses of salmonids: Virus isolation in fish cell lines. Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedure. 2008 Sep.

- [9] Bahich H., E B. Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells: a review. *Toxicology In Vitro*. 1991 5.
- [10] Wise JP, Sr., Winn RN, Renfro JL. Generating new marine cell lines and transgenic species—conference summary. *The Journal of experimental zoology*. 2002 292:217–20.
- [11] Hightower L.H., J.L. R. Recent applications of fishcell culture to biomedical research. *Journal of Experimental Zoology*. 1988 248.
- [12] Clem LW, Bly JE, Wilson M, Chinchar VG, Stuge T, Barker K, et al. Fish immunology: the utility of immortalized lymphoid cells—a mini review. *Veterinary immunology and immunopathology*. 1996 54:137–44.
- [13] Chen MJ, Chiou PP, Liao YH, Lin CM, Chen TT. Development and characterization of five rainbow trout pituitary single-cell clone lines capable of producing pituitary hormones. *The Journal of endocrinology*. 2010 205:69–78.
- [14] L R, W A. Fish cell culture: initiation of a line of pituitary cells from carp (*Cyprinus carpio*) to study the release of gonadotropin in vitro. *In Vitro*. 1982 18:2.
- [15] Nagahama Y, Olivereau M, Farmer SW, Nagahama RS, HA B. Immunocytochemical identification of the prolactin- and growth hormone-secreting cells in the teleost pituitary with antisera to tilapia prolactin and growth hormone. *General and Comparative Endocrinology*. 1981 44.
- [16] ANJUM R. Cytogenetic Investigations on the Wild Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) from Vinh-Phu Province of Capital North Vietnam *INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE & BIOLOGY*. 2005 07.
- [17] Julia Bejar, Juan J. Borrego, Alvarez MC. A continuous cell line from the cultured marinefish gilt-head seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*. 1997 150.
- [18] Ozouf-Costaz, Foresti F. Fish Cytogenetic Research: Advances, Applications and Perspectives. *Netherlands Journal of Zoology*. 1991 42.
- [19] H S. Fish cell lines as a tool in aquatic toxicology. *EXS*. 1998 86.
- [20] N.C. Bols, V.R. Dayeh, Lee LEJ, Schirmer K. Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. *Piscine cell lines in environmental toxicology. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. 2005 6.
- [21] Tong SL, Lee H, Miao HZ. The establishment and partial characterization of a continuous fish cell line FG-9307 from the gill of flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*. 1997 156.
- [22] Freshney RI. *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique* 3rd edition, Wiley-Liss, New York,. 1994.

## 9. 연구 성과

- ※ 연구성과는 먼저 연구마루 성과관리시스템(<http://maru.nrf.go.kr>)에 논문, 특허 등의 성과를 입력한 후 한글 파일로 다운받아 그대로 붙이거나 글자크기 등을 편집하여 첨부함
- 첨부된 성과관리시스템 매뉴얼 참조
  - 성과발생 시마다 지속적으로 성과관리시스템에 입력 요망(추후 조분평 또는 기타 연구보고서 제출 자료로 활용 가능)
  - 모든 연구성과는 연구개시일 이후에 이루어진 것만 인정
  - 논문은 acknowledgement에 사업명과 과제번호가 기재된 실적만 인정
- ※ accepted/in press인 논문은 필요하다고 판단되면 추가로 작성가능

사업명	기본연구지원사업	연구책임자	황일선	주관기관	제주대학교
과제번호	2012R1A1A2042787	과제명	돌돔( <i>Oplegnathus fasciatus</i> ) 유래의 주화세포(cell line) 개발 및 응용		

※산학강좌,기술이전 및 기술평가는 현재 입력 받지 않는 항목입니다.

과학기술/학술적 연구성과(단위 : 건)													
전문학술지 논문게재				초청 강연 실적	학술대회 논문발표		지식재산권				수상 실적	출판실적	
국내논문		국외논문			국내	국제	출원		등록			저역서	보고서
SCI	비SCI	SCI	비SCI				국내	국외	국내	국외			
0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0

인력양성 및 연구시설(단위 : 명,건)							
학위배출		국내외 연수지원				산학강좌	연구기자재
박사	석사	장기		단기			
		국내	국외	국내	국외		
0	0	0	0	0	0	0	0

국제협력(단위 :명,건)						
과학자교류		국제협력기반			학술회의개최	
국내과학자 해외파견	외국과학자 국내유치	MOU체결	국제공동연구	국제사업참여	국내	국제
0	0	0	0	0	0	0

산업지원 및 연구성과 활용(단위 : 건)							
기술확산				연구성과활용(사업화 및 후속연구과제 등)			
기술실시계약	기술이전	기술지도	기술평가	후속연구추진	사업화추진중	사업화완료	기타목적활용
0	0	0	0	0	0	0	0

기타 성과(단위 : 건)				
언론보도 성과	원자력연구개발사업실적(원자력연구개발사업에한함)			
	기술보고서	설계문서	장비구축 및 개발	분석방법개발

0	0	0	0	0
---	---	---	---	---

전문학술지 논문게재 성과정보											
과제번호	게재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지구분	sci 여부	impact Factor	국제공동 연구논문	기여도
2012R1A1A2042787	201311	G e n o m i c characterization, expression analysis, and antimicrobial function of a glyrichin homologue from rock bream, O p l e g n a t h u s fasciatus	Kasthuri, Saranya Revathy; W a n , Q i a n g ; Umasuthan , Navaneetha i y e r ; Bathige, S. D. N. K.; Lim, Bong-Soo ; Jung, Hyung-Bo k; Lee, J e h e e ; Whang, Ilson;	직접입력	FISH & SHELLFISH IMMUNOLOGY	35(5)	국외	SCI등재	2.964	아니오	100

학술대회 논문발표 성과정보						
과제번호	발표년월	학술대회명	저자	논문제목	학술대회구분	개최국
2012R1A1A2042787	201302	Aquaculture 2013	W D N Wickramaarachchi, Ilson Whang, Jehee Lee	M o l e c u l a r characterization and expression analysis of c o m p l e m e n t component 3 in rock bream, Oplegnathus fasciatus	국제학술대회	미국
2012R1A1A2042787	201302	Aquaculture 2013	Ilson Whang, W D N Wickramaarachchi, Jehee Lee	Complenent component 2 from rock bream, Oplegnathus fasciatus: Genomic structural analysis and its inductive transcriptional response for pathogenic infections	국제학술대회	미국

## 10. 기타사항(중요 연구 변경사항 등)

※ 기타 필요한 사항을 기술

[별첨1]

< 대 표 연 구 성 과 >

대표연구업적 요약문			
연구업적 제목	Genomic characterization, expression analysis, and antimicrobial function of a glyrichin homologue from rock bream, <i>Oplegnathus fasciatus</i>		
연구업적 유형	학술지게재논문(√ )    저서( )    역서( )    특허( )		
주관연구책임자 또는 공동연구원 성명	황일선	참여자수	8
<p>■ 본 과제 수행결과로 인한 대표 연구성과 작성 시 기술 내용</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- 논문의 경우 참여자의 역할(제1저자, 교신저자, 참여저자)을 기술</li><li>- 특허의 경우 등록일, 등록국가 및 내용 등을 요약하여 기술</li><li>- 대표연구업적과 관련된 연구과제가 있는 경우 과제 개요 기술(사업명, 과제명, 과제번호 등)</li></ul> <p>- 교신저자</p> <p>- 이 연구 성과는 본 과제인 “돌돔(<i>Oplegnathus fasciatus</i>) 유래의 주화세포(cell line) 개발 및 응용”의 성과임.</p> <p>Antimicrobial peptides are important innate effector molecules, playing a vital role in antimicrobial immunity in all species. Glyrichin is a transmembrane protein and an antibacterial peptide, exerting its functions against a wide range of pathogenic bacteria. In this study, cDNA and a BAC clone harboring the glyrichin gene were identified from rock bream and characterized. Genomic characterization showed that the OfGlyrichin gene exhibited a 3 exone2 intron structure. OfGlyrichin is a 79-amino-acid protein with a transmembrane domain at 22GFMMGFAVGMAAGAMFGTFSLR44. Pairwise and multiple sequence alignments showed high identity and conservation with mammalian orthologues. Phylogenetic analysis showed a close relationship with fish species. Higher levels of OfGlyrichin transcripts were detected in the liver from healthy rock bream which were induced by immunogens like lipopolysaccharide, poly I:C, rock bream irido virus, <i>Edwardsiella tarda</i> and <i>Streptococcus iniae</i>. The synthetic peptide (pOf19) showed antibacterial activity against <i>Escherichia coli</i>, <i>E. tarda</i>, and <i>S. iniae</i>. Analysis of the bacterial morphological features after pOf19 peptide treatment showed breakage of the cell membrane, affirming that antibacterial function is accomplished through membrane lysis. The pOf19 peptide also showed antiviral activity against RBIV infection. The high conservation of the genomic structure and protein, together with the antimicrobial roles of OfGlyrichin, provide evidence for the evolutionary existence of this protein playing a vital role in innate immune defense in rock bream.</p>			